

## PCT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 28 September 2000 (28.09.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/00246	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 1180
<b>International filing date</b> (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
<b>Applicant</b> MIYAUCHI, Kazuhito et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 August 2000 (18.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Diana Nissen</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

11T  
09/18/89  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

FEB 12 2002

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference 1180	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00246	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/61, 1/34		
Applicant KYOWA MEDEX CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of        sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 August 2000 (18.08.00)	Date of completion of this report 26 April 2001 (26.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00246

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00246

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	3-12,19-25	YES
	Claims	1,2,13-18	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-25	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****Claims 1, 2, and 13-18**

Document 1 [JP, 57-137858, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 25 August 1982 (25.08.82)] and document 2 [JP, 59-11197, A (Toyobo Co., Ltd.) 20 January 1984 (20.01.84)] cited in the international search report describe the elimination of free glycerol in a method for quantitating triglycerides that utilizes lipoprotein lipase. Therefore, the inventions set forth in Claims 1, 2, and 13-18 do not appear to be novel.

**Claims 3-12 and 19-25**

In order to inhibit an enzyme reaction with lipoproteins other than a specific lipoprotein, the use of a surfactant that inhibits the reaction of lipoproteins other than the specific lipoprotein or an agent that agglutinates lipoproteins other than the specific lipoprotein was a well-known means prior to the priority date of this application (if necessary, see JP, 8-201393, A or JP, 11-56395, A), and persons skilled in the art can easily perform quantitation of triglycerides using this well-known means in order to quantify the triglycerides within a specific lipoprotein.

# 3.

## 単クローン抗体作製法

### 3.1 実験スケジュールの概略

#### 3.1.1 細胞融合前

	3~6ヶ月前	2~3ヶ月前	4週間前	3週間前	2週間前	5日前	4日前	3日前	2日前	1日前
培地と試薬	ミエローマ細胞増殖培地 500 ml/調製 細胞凍結溶液調製および保存	ウシ胎児血清品質検査用培地準備 品質検査実施	細胞融合用 PEG 溶液調製・凍結保存		基本培地 1/調製 ミエローマ増殖培地 500 ml/調製				HAT培地 500 ml/調製	
器具	ミエローマ細胞培養用、凍結用器具準備	ウシ胎児血清品質検査用器具準備			細胞融合用器具準備完了					
ミエローマ細胞	入手、凍結保存	解凍、培養				解凍→培養→継代→培養→継代→培養				
マウス		BALB/cマウス入手、初回免疫 (6週間前)		BALB/cマウス 2回目免疫	ddYマウス入手、脾細胞・胸腺細胞調製練習			BALB/cマウス最終免疫		ddYマウス胸腺細胞調製

#### 3.1.2 細胞融合後

	細胞融合当日	1週間目	2週間目	3週間目	4週間目	5週間目	6~8週間目
培地と試薬		HT培地 1/調製			ハイブリドーマ増殖培地 1/調製		ハイブリドーマ増殖培地 3/調製
ハイブリドーマ	ミエローマ細胞調製 ↓ 細胞融合 ↓ まき込み (96穴マイクロプレート)	培地交換 (1日後) ↓ 培養 ↓ 培地交換 (3日後) ↓ 培養 ↓ 培地交換 (6日後) ↓ 培養 ↓ 培地交換 (10日後)	培地採取 (12~13日後) ↓ 抗体スクリーニング ↓ 陽性 確認培養 (24穴マイクロプレート中) ↓ 抗体価再確認 ↓ クローニング (96穴マイクロプレート)	クローニング開始後約 10日目 ↓ 抗体スクリーニング ↓ 陽性 2回目クローニング (96穴マイクロプレート)	培地採取 (クローニング開始後約 10日目) ↓ 抗体スクリーニング ↓ 陽性 2回目クローニング (96穴マイクロプレート)	2回目クローニング開始後約 10日目 ↓ 抗体スクリーニング ↓ 陽性 2回目クローニング (96穴マイクロプレート)	培地採取 (2回目クローニング開始後 10日後) ↓ 抗体スクリーニング ↓ 陽性 培養規模拡大、一部凍結 ↓ 大量培養 ↓ 細胞をヌードマウス腹腔内に注射 ↓ 腹水採取
マウス	BALB/cマウス脾細胞調製		ddYマウス胸腺細胞調製		ddYマウス胸腺細胞調製		

# 単クローン抗体 実験操作入門

安東民衛・千葉 丈／著



講談社サイエンティフィク

著者紹介

△ あんどうたみえ  
安東民衛

1974年 東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了  
現在 東京都立衛生研究所・主任研究員

△ ちば じょう  
千葉 丈

1974年 東京教育大学大学院博士課程修了  
現在 東京理科大学基礎工学部・教授

NDC 464 228p. 26 cm



単クローン抗体実験操作入門

1991年11月20日 第1刷発行

定 価 3,800 円 (本体 3,689 円)  
著 者 安東民衛・千葉 丈  
発行者 野間佐和子  
発行所 株式会社 講談社  
〒112-01 東京都文京区音羽 2-12-21  
販売部 (03) 5395-3624  
製作部 (03) 5395-3615  
編 集 株式会社 講談社サイエンティフィック  
代表 加藤勝久  
〒162 東京都新宿区新小川町 9-25 日商ビル  
編集部 (03) 3235-3701  
印刷所 株式会社 廣済堂  
製本所 株式会社 国宝社

落丁本・乱丁本は、講談社書籍製作部宛お送り下さい。  
送料小社負担にてお取替えます。

© Tamie Ando and Jo Chiba, 1991

Printed in Japan

ISBN4-06-153520-X (KS)

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 18 MAY 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 1180	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/00246	国際出願日 (日.月.年) 20.01.00	優先日 (日.月.年) 20.01.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl. <sup>7</sup> C12Q1/61, C12Q1/34		
出願人(氏名又は名称) 協和メデックス株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 18.08.00	国際予備審査報告を作成した日 26.04.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 8114

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	3-12, 19-25	有
	請求の範囲	1, 2, 13-18	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-25	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-25	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1, 2, 13-18について

国際調査報告で引用した文献1, 2(JP, 57-137858, A(和光純薬株式会社)25.8月.1982(25.08.82)、JP, 59-11197A(東洋紡績株式会社)20.1月.1984(20.01.84))には、リポプロテインリパーゼを用いたトリグリセライドの定量法において、遊離のグリセロールをあらかじめ除去することが記載されており、請求の範囲1, 2, 13-18の発明は上記文献1, 2に記載されており、新規性がない。

請求の範囲3-12, 19-25について

特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の酵素反応を阻害するために、特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤、または特定のリポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤を用いることは、本願優先日前既に広く行われた周知の手段(必要があれば、特開平8-201393号公報、特開平11-56395号公報参照。)であり、特定のリポ蛋白中のトリグリセリドを定量するために、上記周知手段を用いてトリグリセリドの定量を行うことは、当業者が容易になし得たことである。

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願を特許協力条約に従って処理されることを請求する。

PTG/PCT Rec'd 20 JUL 2001

国際出願番号	
国際出願日	PCT 20.1.00
(受付印)	受領印

出願人又は代理人の書類記号  
(希望する場合、最大12字)

1180

第 I 欄 発明の名称

リポ蛋白中のトリグリセライドの定量法

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

協和メデックス株式会社 KYOWA MEDEX CO., LTD.  
〒104-0042 日本国東京都中央区入船二丁目1番1号  
1-1, Irifune 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0042 Japan

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

03-3282-0036

ファクシミリ番号:

03-3282-1527

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

宮内 一人 MIYAUCHI Kazuhito  
〒411-0932 日本国静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1  
協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki, Nagaizumi-cho,  
Sunto-gun, Shizuoka 411-0932 Japan

この欄に記載した者は  
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したとき  
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JP

住所 (国名): 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続業に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10657 弁理士 岩橋 和幸 IWAHASHI Kazuyuki  
〒100-8185 日本国東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号  
協和醸酵工業株式会社 知的財産部  
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
Intellectual Property Department  
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan

電話番号:

03-3282-0036

ファクシミリ番号:

03-3282-1527

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

## 第 III 欄の続き その他の出人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

高田 志津代 TAKADA Shizuyo  
〒411-0932 日本国静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1  
協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki, Nagaizumi-cho,  
Sunto-gun, Shizuoka 411-0932 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JP

住所（国名）： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

村上 智美 MURAKAMI Tomomi  
〒411-0932 日本国静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1  
協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories,  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki, Nagaizumi-cho,  
Sunto-gun, Shizuoka 411-0932 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JP

住所（国名）： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

三池 彰 MIIKE Akira  
〒411-0932 日本国静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1  
協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories,  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki, Nagaizumi-cho,  
Sunto-gun, Shizuoka 411-0932 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JP

住所（国名）： 日本国 JP

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。  
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の

指定国についての出願人である：

☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。

## 第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9 (a) の規定に基づき次の指定を行う。 ( ) する□にレ印を付すこと； 少なくとも1つの□にレ印を付すこと。

## 広域域半島

- ☒ **AP** **ARIPO** 半島 : **GH** ガーナ Ghana, **GM** ガンビア Gambia, **KE** ケニア Kenya, **LS** レソト Lesotho, **MW** マラウイ Malawi, **SD** スーダン Sudan, **SL** シエラ・レオネ Sierra Leone, **SZ** スワジランド Swaziland, **UG** ウガンダ Uganda, **ZW** ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア** 半島 : **AM** アルメニア Armenia, **AZ** アゼルバイジャン Azerbaijan, **BY** ベラルーシ Belarus, **KG** キルギス Kyrgyzstan, **KZ** カザフスタン Kazakhstan, **MD** モルドヴァ Republic of Moldova, **RU** ロシア Russian Federation, **TJ** タジキスタン Tajikistan, **TM** トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ** 半島 : **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH** and **LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **CY** キプロス Cyprus, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FI** フィンランド Finland, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **LU** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI** 半島 : **BF** ブルキナ・ファソ Burkina Faso, **BJ** ベナン Benin, **CF** 中央アフリカ Central African Republic, **CG** コンゴ Congo, **CI** コートジボアール Côte d'Ivoire, **CM** カメルーン Cameroon, **GA** ガボン Gabon, **GN** ギニア Guinea, **GW** ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, **ML** マリ Mali, **MR** モーリタニア Mauritania, **NE** ニジェール Niger, **SN** セネガル Senegal, **TD** チャード Chad, **TG** トーゴ Togo, 及びアフリカ知的財産機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## 国内半島 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |  |   |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> アラブ首長国連邦 United Arab Emirates                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> リベリア Liberia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> アルバニア Albania  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> レソト Lesotho   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> アルメニア Armenia  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> リトアニア Lithuania   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> オーストリア Austria   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> ルクセンブルグ Luxembourg  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> オーストラリア Australia  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> ラトヴィア Latvia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> アゼルバイジャン Azerbaijan  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia und Herzegovina                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> マダガスカル Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> バルバドス Barbados   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> ブルガリア Bulgaria   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> モンゴル Mongolia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> ブラジル Brazil  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> マラウイ Malawi   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> ベラルーシ Belarus  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> メキシコ Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> カナダ Canada   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> ノールウェー Norway   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH</b> and <b>LI</b> スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> ニュー・ジージーランド New Zealand                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> 中国 China   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> ポーランド Poland  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> キューバ Cuba  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> ポルトガル Portugal  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> チェコ Czech Republic   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> ルーマニア Romania   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> ドイツ Germany  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> ロシア Russian Federation                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> デンマーク Denmark  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> スーダン Sudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> エストニア Estonia  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> スウェーデン Sweden   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> スペイン Spain   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> シンガポール Singapore  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> フィンランド Finland   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> スロヴェニア Slovenia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> 英国 United Kingdom  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> スロヴァキア Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> グレナダ Grenada   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> シエラ・レオネ Sierra Leone  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> グルジア Georgia   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> タジキスタン Tajikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> ガーナ Ghana  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> ガンビア Gambia  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> トルコ Turkey  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> クロアチア Croatia  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> ハンガリー Hungary  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> ウクライナ Ukraine   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> インドネシア Indonesia   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> ウガンダ Uganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> イスラエル Israel   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> 米国 United States of America                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> インド India  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> アイスランド Iceland   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> 日本 Japan   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> ケニア Kenya  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> キルギス Kyrgyzstan  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> ジンバブエ Zimbabwe  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea                  |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> 韓国 Republic of Korea                                       |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> カザフスタン Kazakhstan  |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> セント・ルシア Saint Lucia  |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> スリ・ランカ Sri Lanka   |   |

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

- ☒ **CR** コスタリカ Costa Rica ☒ **MA** モロッコ Morocco
- ☒ **DM** ドミニカ Dominica
- ☒ **TZ** タンザニア Tanzania

指定の承認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9 (b) の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が承認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその承認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の承認は、指定を待定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この承認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

## 第VI欄 優先権主張書

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願 : 国名	広域出願 : * 広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 20. 01. 99	平成11年特許願 第 12434号	日本国 JP		
(2)				
(3)				

☒ 上記 ( ) の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

\* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

## 第VII欄 国際調査結果の選択

国際調査結果の選択 (ISA) の選択

ISA / JP

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名（又は広域官庁）

## 第VIII欄 照会合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書	4 枚
明細書（配列表を除く）	16 枚
請求の範囲	3 枚
要約書	1 枚
図面	3 枚
明細書の配列表	0 枚
合計	27 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- |   |   |
|---|---|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙              | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の( )の番号を記載する）   |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）   |
| <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面               | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面       |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状        | 8. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク） |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し                        | 9. <input type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する）            |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書                    |   |

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

## 第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

岩橋 和幸



## 1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

受理官庁記入欄

## 2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された  
国際調査機関

ISA / JP

6. ☐

調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用享しを送付していない

記録原本の受理の日

様式PCT/RO/101（最終用紙）（1998年7月：再版1999年7月）

## PCT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IWAHASHI, Kazuyuki  
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.  
Intellectual Property Dept.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 16 March 2000 (16.03.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 1180	
International application No. PCT/JP00/00246	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant KYOWA MEDEX CO., LTD. et al	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)  Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
20 Janu 1999 (20.01.99)	11/12434	JP	10 Marc 2000 (10.03.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Taïeb Akremi

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

IWAHASHI, Kazuyuki  
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.  
Intellectual Property Dept.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

RECEIVED

AUG - 7, 2000

I.P. DEPT

Date of mailing (day/month/year) 27 July 2000 (27.07.00)		
Applicant's or agent's file reference 1180		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/00246	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
Applicant KYOWA MEDEX CO., LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 27 July 2000 (27.07.00) under No. WO 00/43537

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

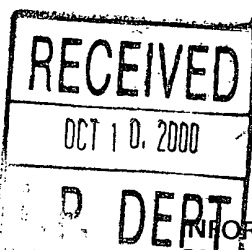
If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IWAHASHI, Kazuyuki  
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.  
Intellectual Property Dept.  
6-1, Ohtemachi 1-chome  
Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185  
JAPON

INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

Date of mailing (day/month/year) 28 September 2000 (28.09.00)		
Applicant's or agent's file reference 1180		
<b>IMPORTANT INFORMATION</b>		
International application No. PCT/JP00/00246	International filing date (day/month/year) 20 January 2000 (20.01.00)	Priority date (day/month/year) 20 January 1999 (20.01.99)
Applicant KYOWA MEDEX CO., LTD. et al		

- The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:  
 AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW  
 EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE  
 National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US
- The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:  
 EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM  
 OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG  
 National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW
- The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).  
 Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.  
 The entry into the European regional phase is postponed **until 31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Diana Nissen Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PTO/PCT Rec'd 20 JUL 2001

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference  
(if desired) (12 characters maximum)

1180

**Box No. I TITLE OF INVENTION**

METHOD FOR QUANTITATING TRIGLYCERIDES IN LIPOPROTEINS

**Box No. II APPLICANT**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KYOWA MEDEX CO., LTD.  
1-1, Irifune 2-chome, Chuo-ku, Tokyo  
104-0042 Japan

☐ This person is also inventor.

Telephone No. 03-3282-0036

Facsimile No. 03-3282-1527

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☒ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MIYAUCHI Kazuhito  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki,  
Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka  
411-0932 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

10657 IWAHASHI Kazuyuki  
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
Intellectual Property Department  
6-1, Ohtemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo  
100-8185 Japan

Telephone No. 03-3282-0036

Facsimile No. 03-3282-1527

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

## Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

TAKADA Shizuyo  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki,  
Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka  
411-0932 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MURAKAMI Tomomi  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki,  
Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka  
411-0932 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

MIIE Akira  
c/o Kyowa Medex Research Laboratories  
KYOWA MEDEX CO., LTD.  
600-1, Aza-Kamiyamaji, Minamiishiki,  
Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka  
411-0932 Japan

This person is:

- ☐ applicant only  
☒ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only  
☐ applicant and inventor  
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

- ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**Box No.V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

**Regional Patent**

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

- |  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> United Arab Emirates                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albania                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lithuania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Austria                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Latvia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaijan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Morocco  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnia and Herzegovina               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republic of Moldova  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgaria                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> The former Yugoslav Republic of Macedonia                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brazil                               |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norway   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> New Zealand  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Poland   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Czech Republic                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Germany                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Romania  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Denmark                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russian Federation   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominica                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Sweden   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Spain                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapore  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finland                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovenia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> United Kingdom                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tajikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turkey   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatia                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad and Tobago  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hungary                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TZ</b> United Republic of Tanzania                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> India                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> United States of America                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Iceland                              |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Uzbekistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kyrgyzstan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yugoslavia   |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> Democratic People's Republic of Korea           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> South Africa   |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republic of Korea                    | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                           | <input type="checkbox"/>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                          | <input type="checkbox"/>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                            |  |

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

**Box No. VI PRIORITY CLAIM**☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 20.01.99	Patent Application 11-12434	Japan		
item (2)				
item (3)				

☐ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

**Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

**Choice of International Searching Authority (ISA)**  
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA/ JP

**Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):**

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

**Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING**

This international application contains the following number of sheets:

request : 4  
description (excluding  
sequence listing part) : 16  
claims : 3  
abstract : 1  
drawings : 3  
sequence listing part  
of description : 0

Total number of sheets : 27

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☒ fee calculation sheet
2. ☒ separate signed power of attorney
3. ☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:
4. ☐ statement explaining lack of signature
5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6. ☐ translation of international application into (language):
7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9. ☐ other (specify):

Figure of the drawings which  
should accompany the abstract:

Language of filing of the  
international application:

Japanese

**Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT**

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

IWAHASHI Kazuyuki

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:  <input type="checkbox"/> received:  <input type="checkbox"/> not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/ JP	
6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau:

This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application.

# PCT

## FEE CALCULATION SHEET Annex to the Request

For receiving Office use only

International application No. \_\_\_\_\_

Date stamp of the receiving Office \_\_\_\_\_

Applicant's or agent's  
file reference

1180

Applicant

KYOWA MEDEX CO., LTD.

### CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE

18,000

T

2. SEARCH FEE

77,000

S

International search to be carried out by \_\_\_\_\_

(If two or more International Searching Authorities are competent in relation to the international application, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

The international application contains 27 sheets.

first 30 sheets

46,000

b1

remaining sheets

x additional amount

b2

Add amounts entered at b1 and b2 and enter total at B

46,000

B

Designation Fees

The international application contains 82 designations.

8

x

9,900

=

79,200

D

number of designation fees  
payable (maximum 8)

amount of designation fee

Add amounts entered at B and D and enter total at I  
(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the total to be entered at I is 25% of the sum of the amounts entered at B and D.)

125,200

I

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable)

P

5. TOTAL FEES PAYABLE

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

220,200

TOTAL

☐ The designation fees are not paid at this time.

### MODE OF PAYMENT

☐ authorization to charge  
deposit account (see below)

☐ bank draft

☐ coupons

☐ cheque

☐ cash

☐ other (specify): \_\_\_\_\_

☐ postal money order

☐ revenue stamps

### DEPOSIT ACCOUNT AUTHORIZATION (this mode of payment may not be available at all receiving Offices)

The RO/ \_\_\_\_\_

☐

is hereby authorized to charge the total fees indicated above to my deposit account.

☐

(this check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) is hereby authorized to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above to my deposit account.

☐

is hereby authorized to charge the fee for preparation and transmittal of the priority document to the International Bureau of WIPO to my deposit account.

Deposit Account No. \_\_\_\_\_

Date (day/month/year) \_\_\_\_\_

Signature \_\_\_\_\_



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 1180	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/00246	国際出願日 (日.月.年) 20.01.00	優先日 (日.月.年) 20.01.99
出願人(氏名又は名称) 協和メデックス株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C121Q1/61

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>7</sup> C121Q1/26~1/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 57-137858, A (和光純薬工業株式会社) 25. 8月. 1982 (25. 08. 82) (ファミリーなし)	1-25
X	JP, 59-11197, A (東洋紡績株式会社) 20. 1月. 1984 (20. 01. 84) (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 58-47499, A (株式会社ヤトロン) 19. 3月. 1983 (19. 03. 83) (ファミリーなし)	1-25
A	JP, 9-121895, A (株式会社ヤトロン) 13. 5月. 1997 (13. 05. 97) (ファミリーなし)	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 00

国際調査報告の発送日

0 2.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



PTG/PCT Rec'd 20 JUL 2001

知的所有権機関  
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12Q 1/61	A1	(11) 国際公開番号 WO00/43537  (43) 国際公開日 2000年7月27日(27.07.00)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00246</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月20日(20.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/12434 1999年1月20日(20.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和メデックス株式会社 (KYOWA MEDEX CO., LTD.)[JP/JP] 〒104-0042 東京都中央区入船二丁目1番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 宮内一人(MIYAUCHI, Kazuhito)[JP/JP] 高田志津代(TAKADA, Shizuyo)[JP/JP] 村上智美(MURAKAMI, Tomomi)[JP/JP] 三池 彰(MIIKE, Akira)[JP/JP] 〒411-0932 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 岩橋和幸(IWAHASHI, Kazuyuki) 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 知的財産部 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: METHOD FOR QUANTITATING TRIGLYCERIDE IN LIPOPROTEIN</p> <p>(54) 発明の名称 リポ蛋白中のトリグリセライドの定量法</p> <p>(57) Abstract A method for conveniently quantitating a TG in various lipoproteins. This method is characterized by eliminating free glycerol from a sample containing free glycerol and a TG in a specific lipoprotein, treating the residue with lipoprotein lipase and an enzymatic system whereby hydrogen peroxide is formed from free glycerol, and then quantitating the hydrogen peroxide thus formed to thereby quantitate the TG in the specific lipoprotein.</p>		

(57)要約

種々のリボ蛋白中のTGを簡便に定量する方法を提供すること。

遊離のグリセロールおよび特定のリボ蛋白中のトリグリセライド(TG)を含む試料から遊離グリセロールを消去した後、得られた試料にリボプロテインリパーゼ、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することを特徴とする特定のリボ蛋白中のTGの定量法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

リボ蛋白中のトリグリセライドの定量法

### 技術分野

本発明は、臨床検査分野で特に動脈硬化症の危険因子として意義のある脂質中のトリグリセライド (TG) の定量法に関する。

### 背景技術

現在、臨床検査分野では、高密度リボ蛋白 (HDL) 中のコレステロールは動脈硬化症の危険因子として負の因子、低密度リボ蛋白 (LDL) 中のコレステロールは正の因子とされており、頻繁に定量されている。また、虚血性心疾患を主体とする動脈硬化性疾患の発現には、高脂血症が大きな要因であることが多くの疫学的な調査によって明確にされてきた。また、超低密度リボ蛋白 (VLDL) のアポE蛋白の中で、E1はレセプターによって取り込まれるが、III型高脂血症に関係のあるE2は取り込まれない〔動脈硬化, 25(11・12), 415-420 (1998)、医学のあゆみ, 172(5), 276-280 (1995)〕。このように、現在までに、リボ蛋白については、動脈硬化の危険因子として種々の面から取り上げられてきた。

さらに、近年、リボ蛋白中に含まれる脂質の種類および量の違いが種々の疾患に関与していると言われている。その中で、家族性高脂血症に関しては、LDLの中でも特にスモールデンス (小型高密度) LDLが、関連の深い動脈硬化の正の因子であるとの報告もある。スモールデンスLDLは、VLDLからTGの異化酵素の作用によって生じるLDLであり、スモールデンスLDL中では、通常のLDL中と比較した場合、TG含量とコレステロール含量の比が変化しており、TG含量の割合が高くなっている〔医学のあゆみ, 164(12), 833-836 (1993)〕。従って、LDL中のTG濃度が高いとき (スモールデンスLDLの指標となる)、動脈硬化になる危険率が高くなると考えられている。

各リボ蛋白中のTGを特異的に定量する方法としては、例えば超遠心により各リボ蛋白を分画分取し、その中に含まれるTGを例えばリボ蛋白リパーゼ

(LPL)、グリセロールキナーゼ (GK)、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼからなる酵素系で処理することにより過酸化水素を発生させ、次いで生じた過酸化水素とパーオキシダーゼ (POD) により色素源を発色させて比色定量する方法等が考えられるが、この方法では、超遠心に時間や手間がかかり、非常に煩雑である。

#### 発明の開示

本発明の目的は、種々のリボ蛋白中のトリグリセライド (TG) を簡便に定量する方法を提供することにある。

血清、血漿検体等には、遊離グリセロールや、種々のリボ蛋白中のTGが存在する。本発明は、これら種々のリボ蛋白の中で特定のリボ蛋白中に存在するTGを目的のリボ蛋白を分離することなく特異的に定量しようとするものである。このため、定量に影響する遊離グリセロールは何らかの形で反応しないものに変化させる必要がある他、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中のTGを反応に関与しないものにあらかじめ変化させるか、または反応させないように阻害させることが必要である。

本発明は、遊離グリセロールおよび特定のリボ蛋白中のTGを含有する試料から遊離グリセロールを消去した後、得られた試料にリボプロテインリパーゼ (LPL)、および該反応により得られたグリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することを特徴とする特定のリボ蛋白中のTGの定量法に関する。

リボ蛋白中のTGを含有する試料としては、血清、血漿等の検体があげられる。

LPLとは、リボ蛋白中のTGをグリセロールと脂肪酸に分解する機能を有する酵素 (EC.3.1.1.34) を示す。

グリセロールから過酸化水素を発生する酵素系としては、グリセロールをATPの存在下グリセロール-3-リン酸に変換する機能を持つグリセロールキナーゼ (GK) (EC.2.7.1.30) とグリセロール-3-リン酸から過酸化水素を発生させるグリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (GPO) (EC.1.1.3) を含有する系、

あるいはグリセロールを基質として過酸化水素を発生させるグリセロールオキシダーゼ (GO) (E C. 1.1.3.21) を含有する系があげられる。

本発明の一つの形態としては、遊離グリセロールを消去する方法が、遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系によりグリセロールを分解すると共に過酸化水素を発生させ、該過酸化水素を更に除去する方法であることがあげられる。

また係る方法によりグリセロールを消去した後、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬の存在下に、得られた試料に L P L、および該反応により得られたグリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することにより、特定のリボ蛋白中の T G を定量することができる。

特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬としては、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する界面活性剤および／または特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の凝集剤等があげられる。

また、特定のリボ蛋白中の T G からの L P L によるグリセロールの発生を容易にするため、遊離グリセロールの消去後の定量過程において、特定のリボ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を存在させることもできる。

本発明の別の形態においては、遊離グリセロールを消去する際に、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中の T G も同時に遊離グリセロールに変換することにより消去する方法を選択することもできる。

例えば、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬の存在下に、L P L および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去することにより特定のリボ蛋白中の T G 以外の全ての T G を消去することができる。

該消去反応の後、試料に L P L およびグリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することにより特定のリボ蛋白中の T G を定量することができる。

特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬としては、特定のリボ蛋白の反応を阻害する界面活性剤および／または特定のリボ蛋白の凝集剤等があげられる。

また、特定のリボ蛋白中のTGからのLPLによるグリセロールの発生を容易にするため、遊離グリセロールおよび特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中のTGの消去後、特定のリボ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を添加することもできる。

本発明により、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK、GPOおよびパーオキシダーゼを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬、あるいは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GOおよびパーオキシダーゼを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬を提供することができる。特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬を含有する場合、さらに、特定のリボ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を含有させることができる。

また、本発明により、最終反応液において特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK、GPOおよびパーオキシダーゼを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬、あるいは最終反応液において特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GOおよびパーオキシダーゼを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬を提供することができる。

前記したそれぞれの定量試薬においては、成分により2つ以上の試薬に分かれたキット形態のものも含まれる。

なお、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害するとは、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中のTGのLPLによるグリセロールへの分解等の酵素反応を直接的または間接的に阻害する結果、特定のリボ蛋白中のTGを選択的に酵素反応

を受け得る状態にならしめることをいう。また、特定のリポ蛋白の反応を可能にするとは、特定のリポ蛋白中のTGを基質とするLPLによるグリセロールへの分解反応を、特定のリポ蛋白への直接または間接的な作用により、受け得る状態にならしめることをいう。

以下に本発明の測定方法を具体的に説明する。

特定のリポ蛋白がHDLの場合

HDL中のTGの測定においては、HDL中のTGの測定結果にHDL以外のリポ蛋白質（具体的にはLDLおよびVLDL）中のTGの混在による測定誤差が生じることを防止するため、LDLおよびVLDL中のTGがLPLにより分解されることを防止するための試薬であるHDL以外のリポ蛋白の凝集剤、HDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤等のHDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する試薬を添加することが好ましい。

例えば、緩衝剤を含んだ水溶液に、試料、GKおよびGPOまたはGOを添加することにより試料中の遊離グリセロールから過酸化水素を発生させ、生じた過酸化水素を消去する酵素である、例えばカタラーゼ、またはカップリング型色素源の一方とパーオキシダーゼとを反応溶液に同時に加え10～50℃、好ましくは25～40℃で3～10分間、好ましくは4～5分間反応させる。

係る反応により試料中の遊離のグリセロールは全て除去される。

次いでLPL、またはHDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤とLPLを反応溶液に添加しHDL中のTGからグリセロールを生じさせる。生じたグリセロールから反応溶液中のGKおよびGPOまたはGOにより過酸化水素が発生するが、先にカップリング型色素源の一方とパーオキシダーゼを加えている場合はカップリング型色素源の他方を、カタラーゼを加えている場合はカップリング型色素とパーオキシダーゼを反応溶液に添加し10～50℃、好ましくは25～40℃で2分間以上、好ましくは3～10分間反応させる。

上記反応により生成した色素を定量することによりHDL中のTGの定量が行うことができる。

なお、HDL以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬は、遊離グリセロールの消去反応時に添加しておいても良い。また、必要によりGKの反応に必要なATP等酵素反応の遂行に必要な補助因子やアスコルビンオキシダーゼ等血清中の妨害物質の除去剤を緩衝液中に添加してもよい。

HDL以外のリボ蛋白の凝集剤としては、ポリアニオンと2価の金属塩の組合せ、HDL以外のリボ蛋白を凝集させる抗体、ポリオキシエチレングリコール(PEG)等があげられる。ポリアニオンとしては、ヘパリンもしくはその塩、リンタングステン酸もしくはその塩、デキストラン硫酸もしくはその塩、硫酸化シクロデキストリンもしくはその塩、硫酸化オリゴ糖もしくはその塩等があげられ、シクロデキストリンとしては、 $\alpha$ -シクロデキストリン、 $\beta$ -シクロデキストリン、 $\gamma$ -シクロデキストリン等があげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘptaオース等があげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩等があげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩、コバルト塩等があげられ、中でもマグネシウム塩が好ましい。

ポリアニオンは、0.1 g/L ~ 50 g/Lで使用されるのが好ましい。例えば、0.02 ~ 10 mMの分子量5000 ~ 20000のヘパリンもしくはその塩、0.1 ~ 10 mMの分子量4000 ~ 8000のリンタングステン酸もしくはその塩、0.01 ~ 5 mMの分子量10000 ~ 500000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1 ~ 20 mMの分子量1000 ~ 10000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1 ~ 50 mMの分子量1000 ~ 3000の硫酸化シクロデキストリンもしくはその塩、0.1 ~ 50 mMの分子量400 ~ 3000の硫酸化オリゴ糖もしくはその塩またはそれらの混合物等が好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03 ~ 1 mMの分子量14000 ~ 16000のヘパリンもしくはその塩、0.1 ~ 3 mMの分子量5000 ~ 7000のリンタングステン酸もしくはその塩、0.01 ~ 5 mMの分子量150000 ~ 25



0000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1~10mMの分子量1000~5000のデキストラン硫酸もしくはその塩、0.1~10mMの分子量1000~2000の硫酸化シクロデキストリンもしくはその塩、0.1~10mMの分子量400~2000の硫酸化オリゴ糖もしくはその塩またはそれらの混合物等が用いられる。

2価の金属塩としては、0.1~50mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩、コバルト塩等が用いられ、好ましくは、0.1~50mMのマグネシウム塩が用いられる。

HDL以外のリポ蛋白を凝集させる抗体としては、抗アポB抗体、抗アポC抗体等があげられる。抗アポB抗体、抗アポC抗体としては、人血清より精製したアポ蛋白Bまたはアポ蛋白Cを家兎に免疫して得られる抗アポB抗血清または抗アポC抗血清を硫酸沈殿、塩析して得られるIgG画分、あるいは上記アポ蛋白Bまたはアポ蛋白Cをマウスに免疫して得られる抗アポBモノクローナル抗体、抗アポCモノクローナル抗体（単クローン抗体実験操作入門、安東民衛著、講談社サイエンティフィック、21頁、1991年）等があげられる。

PEGとしては、0.3~100mMの分子量4000~25000のPEGが好ましく用いられ、さらに好ましくは、1.0~50mMの分子量5000~22000のPEGが用いられる。

HDL以外のリポ蛋白の反応を阻害する界面活性剤としては、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル、ポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレングリコール-ポリオキシプロピレングリコール縮合物〔プルロニックF-68、プルロニックF-88（旭電化）等〕、ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等の特開平8-201393に示されている界面活性剤や、エマルゲン220、エマルゲン913、エマル20C、エマルゲンB-66等のポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤と言われる界面活性剤、ドデシルベンゼンスルホン酸塩等のアニオン系界面活性剤、コール酸、デオキシコール酸等

の胆汁酸系界面活性剤等があげられる。好ましくは、ブルロニック F-68 やブルロニック F-88 (旭電化) 等の類、エマルゲン 220、エマルゲン 913、エマール 20C、エマルゲン B-66、ドデシルベンゼンスルホン酸塩等があげられる。界面活性剤の濃度としては、0.01~5%の範囲が好ましい。

## (2) 特定のリボ蛋白が LDL の場合

LDL 中の TG の測定法においては、LDL 以外のリボ蛋白質 (具体的には HDL および VLDL) 中の TG を遊離のグリセロールに変換し、試料中の遊離のグリセロールと共に全て消去した後に、LDL 中の TG を特異的に定量することが可能である。このため LDL 中の TG の定量は、まず、LDL 以外のリボ蛋白中の TG を、ポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテル [HLB (界面活性剤の構造中の親油性部分と親水性部分のバランスの指標) 15 以上]、ポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤と言われる界面活性剤等の LDL 以外のリボ蛋白を反応させる界面活性剤、またはこれら界面活性剤と LDL 凝集剤 [ポリアニオン (2 価の金属塩を含む場合もある)、LDL を凝集させる抗体等] の組み合わせ等の LDL 以外のリボ蛋白を反応させる試薬の存在下で LPL と反応させ遊離のグリセロールに変換させることを特徴として以下のように行うことが好ましい。

緩衝剤の入った水溶液に、試料、LDL 以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK および GPO の組み合わせまたは GO を添加する。試料中の LDL 以外のリボ蛋白中の TG は LPL の作用により、遊離のグリセロールに分解されるが、試料中にもともと存在する遊離のグリセロールと共に、GK および GPO または GO の酵素系により分解され過酸化水素が発生する、発生する過酸化水素を消去する目的で、前記カタラーゼ、またはカップリング型色素源の一方とパーオキシダーゼを前記 LPL と同時に緩衝液に加え、10~50℃、好ましくは 25~40℃で 3~10 分間、好ましくは 4~5 分間反応させる。

係る反応により LDL 中の TG 以外の全ての TG は消去される。

次いで LDL の反応を可能にする界面活性剤とカップリング型色素源の他方、

あるいはこれら界面活性剤とL P Lを反応溶液に添加することにより、L D L中のT Gはグリセロールに分解され、さらに反応液中に存在するG KおよびG P OまたはG Oの酵素系により分解され過酸化水素が発生する。発生する過酸化水素を定量するため、カップリング型色素源の一方とパーオキシダーゼをすでに添加している場合はとカップリング型色素源の他方を、カタラーゼをすでに添加している場合はカップリング型色素源とパーオキシダーゼを反応溶液に添加し、更に10～50℃、好ましくは25～40℃で2分以上、好ましくは3～10分間反応させる。

前記方法により、L D L中のT Gを特異的に定量することができる。

なお、酵素反応の遂行を容易にするためG Kの反応に必要なA T P等補助因子を緩衝液中に添加しておいても良い。

L D L以外のリボ蛋白中のT Gを消去する際に使用されるL D L以外のリボ蛋白を反応させる界面活性剤としては、前記H D L定量の例中に記載された界面活性剤の他、エマルゲンA-60等、H L Bの比較的高い界面活性剤等があげられる。具体例には、前記界面活性剤の他、ノニオンNS-220、NS-230、NS-240、HS-220、HS-240等のポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテルがあげられ、これらはゴム・プラスチック乳化剤であり、H L Bが15以上のものが多い。また、これらは混合物として用いることもできる。一般に、H L Bには加成性があり、H L Bの高いものと低いものを組み合わせて適当なH L Bに調整することも常識である。界面活性剤の濃度としては、0.01～5%の範囲が好ましい。

L D L以外のリボ蛋白中のT Gを消去する際に使用されるポリアニオン、2価の金属塩、L D Lを凝集させる抗体としては、前記H D L定量の例中に記載されたポリアニオン、2価の金属塩、H D L以外のリボ蛋白を凝集させる抗体等があげられる。

L D Lの反応を可能にする界面活性剤としては、L D Lを溶解する非イオン系界面活性剤、例えばエマルゲン709、トリトンX-100、トリトンD F-1

6、トリトンL O-5等が単独もしくは組み合わせて使用される。具体的には、トリトンD F-16（シグマ）、エマルゲン709（花王）等の可溶化能の高い界面活性剤があげられる。界面活性剤の濃度としては、0.01～5%の範囲が好ましい。

酵素としては、通常市販されている、L P L、G K、G P O、G O、パーオキシダーゼ等があげられ、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリオキシエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基等の構造に糖類を含む基、スルホプロピル基、ポリウレタン基等で上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作によってこれらの遺伝子を取り、別の微生物に導入して発現させた酵素またはこれらを化学的に修飾した修飾体、あるいはこれらの遺伝子を改変して発現させた酵素またはこれらを化学的に修飾した修飾体等も好適に用いられる。

酵素を修飾するための試薬（化学修飾剤）としては、例えば、ポリオキシエチレングリコールにアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物 {ポリオキシエチレングリコールにN-ヒドロキシサクシニミド基等のアミノ基と結合可能な基を結合させたサンブライトV F M 4 1 0 1 [日本油脂（株）製]等}、ポリオキシアルキレングリコール構造および酸無水物構造を有するサンブライトA K M シリーズ、同A D M シリーズ、同A C M シリーズ [いずれも日本油脂（株）製：化学工学論文集、第20巻、第3号、459頁、1994年]、ポリオキシエチレングリコールとポリオキシプロピレングリコールの共重合体にアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物、ポリオキシエチレングリコールモノメタクリルモノメチルエーテルと無水マレイン酸の共重合体等があげられる。また、ポリウレタンの化学修飾剤であるポリウレタンP 4 0 0 0 activated（ベーリンガー・マンハイム社製 Enzyme modification set 能書）、デキストランの化学修飾剤であるデキストランT 4 0，TCT-activated（同）、1，3-プロパンサルトン等も使用できる。これら化学修飾剤により、酵素を、ポリオキシエチレングリコールを主成分とする基、ポリオキシプロピレングリコールを主成分とする基、ポリオキシ

プロピレングリコールとポリオキシエチレングリコールの共重合体を有する基、構造に糖類を含む基、スルホプロピル基、ポリウレタン基等で修飾することができる。

次に、酵素に上記化学修飾剤を反応させる方法を例示するが、本願発明は、これによって制約されない。まず、酵素をpH 8以上のヘブス緩衝液等の緩衝液中に溶解し、0～50℃で例えば0.01～500倍モル量のサンブライトを添加し、5～60分間攪拌する。この反応液をそのままあるいは必要に応じて限外濾過膜により低分子物を除去して用いる。

本発明に用いる酵素等の必要量は、LPLは0.1～20単位(U)/ml、GKは0.2～30U/ml、GPOは1～50U/ml、パーオキシダーゼは1～100U/ml、GOは2～200U/mlで使用するのが好ましい。またGKを用いる際に必要なATPの量は0.05mg/ml～5mg/mlである。

過酸化水素を検出する色素源としては、4-アミノアンチピリンとフェノール、4-クロロフェノール、m-クレゾール、3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨード安息香酸(HTIB)等のフェノール類との組合せの他、4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬として知られている(同仁化学研究所第19版総合カタログ、1994年)N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N,N-ジメチル-m-トルイジン、N,N-ジスルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジ

メチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン等のアニリン類あるいはN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン、N-スルホプロピル-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシ-4-フルオロアニリン等との組み合わせ(カップリング型色素源)が好適である。また、10-(N-カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン(MCDP)やビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等も使用できる。これら色素源の濃度としては、0.02~2 g/Lが適当である。

本発明においては、液に緩衝能をもたせる緩衝剤を使用することもできるが、該緩衝剤としては、リン酸塩、ホウ酸塩、有機酸塩等の他、グッド、トリスの緩衝剤等が好適に用いられ、濃度としては、10~200 mMが好適である。pHは5~9の範囲が好ましい。

#### 図面の簡単な説明

第1図 HDL、LDLおよびVLDL画分を使用し総TG測定用試薬により測定された吸光度のタイムコースを示すものである。

第2図 HDL、LDLおよびVLDL画分を使用し実施例1の方法により測定された吸光度のタイムコースを示すものである。

第3図 HDL、LDLおよびVLDL画分を使用し実施例2の方法により測定された吸光度のタイムコースを示すものである。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例を示す。

# 実施例 1 LDL中TGの測定

試薬 1 (pH = 6.25)	緩衝剤 [ピペラジン-1, 4-ビス (2-エタン スルホン酸) (PIPES)]	50mM
	TOOS (同仁化学)	0.3g/L
	ATP・2ナトリウム塩 (和光純薬)	2.5g/L
	アスコルビン酸オキシダーゼ (旭化成)	3kU/L
	GK (東洋紡)	1kU/L
	GPO (旭化成)	8kU/L
	パーオキシダーゼ (東洋紡)	20kU/L
	PEG修飾LPL (東洋紡)	1.5kU/L
	LPL IIII (天野)	60kU/L
	ノニオンNS-230 (日本油脂)	0.1%
	硫酸マグネシウム・7水和物 (和光純薬)	0.5g/L
試薬 2 (pH = 6.25)	緩衝剤 (PIPES)	50mM
	エマルゲン709	0.6%
	トリトンDF-16	0.3%
	4-アミノアンチピリン (和光純薬)	0.5g/L

日立7170型自動分析機を用い、下記のパラメーター条件でタイムコースをとり、特異性の確認を行った。検体としては、人血清より超遠心して分画されたHDL、LDLおよびVLDL画分を使用した。各リポ蛋白中のTGを総TG測定用試薬 (協和メデックス) で測定した場合のタイムコースを第1図に示し、上記試薬で測定した場合のタイムコースを第2図に示す。総TG測定用試薬で処理した場合には、それぞれのリポ蛋白中のTG全てが反応するのに対して、上記試薬で処理した場合には、第一反応で検体中の遊離グリセロールおよびHDL、VLDL中のTGが先に反応して過酸化水素が発生し、該過酸化水素がカタラーゼ

によって同時に消去され、試薬2を添加した時点ではLDLのみの反応しか起こらず、特異的にLDL中のTGが定量される系が構築された。また、同じ日立7170形を使用して、下記のパラメータを入れて健常人血清検体を、分画をせずにそのまま検体として分析を行った。標準液としては、上記分画LDLを使用し、その値としては、デタミナーL TG（協和メデックス社製）で測定された値を分析機のパラメータとして入れた。

このようにして得られた分析値について、対照法としての下記の方法から得られる値との比較を行った所、相関係数0.918が得られた。

（対照法）米国CDCによって定められたHDL測定標準法に沿って各検体を超遠心して得られるHDL、LDL画分の総TGを定量し（TG（L+H））、定められた分画剤（ヘパリン-マンガン）を投入し、沈殿分離して得られたHDL分のTG（H）値との差〔TG（L+H）-TG（H）〕を使用した。

（パラメータ）

分析法：2ポイントエンド、

測光ポイント：16-34、範囲：10分

測定波長：546nm、副波長：700nm

検体量：3.2μl

試薬量R1：240μl R2：80μl

実施例2 HDL中TGの測定

試薬1（pH=6.25）	緩衝剤（PIPES）	50mM
	TOOS（同仁化学）	0.3g/L
	ATP・2ナトリウム塩（和光純薬）	2.5g/L
	アスコルビン酸オキシダーゼ（旭化成）	3kU/L
	GK（東洋紡）	1kU/L
	GPO（旭化成）	8kU/L
	カタラーゼ（シグマ）	300kU/L
	デキストラン硫酸ナトリウム	0.2g/L



	硫酸マグネシウム・7水和物（和光純薬）	0.5g/L
試薬2（pH=6.25）	緩衝剤（PIPES）	50mM
	エマルゲンB-66（花王）	20g/L
	塩化カルシウム・2水和物	0.1g/L
	4-アミノアンチピリン（和光純薬）	0.5g/L
	アジ化ナトリウム	0.5g/L
	LP L（旭化成）	1000kU/L
	パーオキシダーゼ（東洋紡）	20kU/L

日立7170型自動分析機を用い、下記のパラメーター条件でタイムコースをとり、特異性の確認を行った。検体としては、人血清より超遠心して分画された実施例1と同じHDL、LDLおよびVLDL画分を使用した。第3図に示されるように、第一反応では試薬1で処理することにより遊離グリセロールが先に反応して過酸化水素が発生し、該過酸化水素がカタラーゼによって同時に消去され、試薬2を添加した時点ではHDLのみの反応しか起こらず、特異的にHDL中のTGが定量される系が構築された。また、同じ日立7170形を使用して、健常人血清検体を分画せずにそのまま検体として分析を行った。標準液としては、上記分画HDLを使用し、その値としては、デタミナーL TG（協和メデックス社製）で測定された値を分析機のパラメータとして入れた。

このようにして得られた分析値について、対照法としての下記の方法から得られる値との比較を行った所、相関係数0.911が得られた。

（対照法）米国CDCによって定められたHDL測定標準法に沿って各検体を超遠心して得られるHDL、LDL画分に定められた分画剤（ヘパリン-マンガン）を投入し、沈殿分離して得られた上清中のHDL分のTG値を使用した。

（パラメータ）

分析法：2ポイントエンド、

測光ポイント：16-34、範囲：10分

測定波長：546nm、副波長：700nm

検体量：3.2  $\mu$ l

試薬量 R 1：240  $\mu$ l      R 2：80  $\mu$ l

産業上の利用可能性

本発明により、種々のリポ蛋白中のTGを簡便に定量する方法が提供される。  
特に、LDL中のTGを定量することにより、スモールデンスLDLの生成量の  
指標が得られ、ひいては、動脈硬化予防につなげることができる。

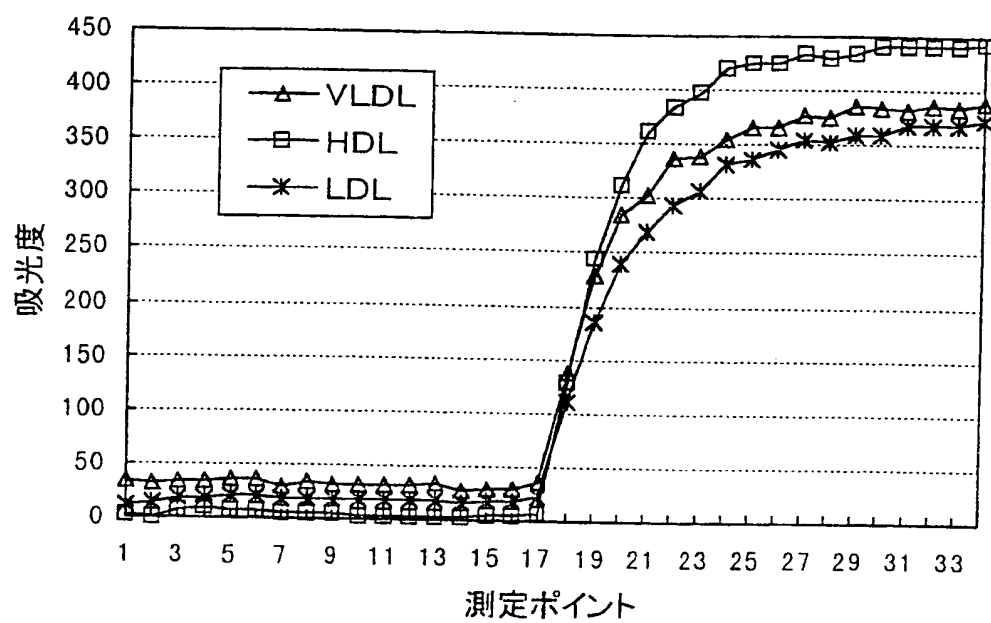
## 請求の範囲

1. 遊離のグリセロールおよび特定のリボ蛋白中のトリグリセライド (TG) を含有する試料から遊離グリセロールを消去した後、得られた試料にリボプロテインリパーゼ (LPL)、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系を作用させ、発生する過酸化水素を定量することを特徴とする特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
2. 遊離グリセロールを消去する方法が、遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去する方法である請求項1記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
3. 発生する過酸化水素を定量する際に特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬を存在させることを特徴とする請求項2記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
4. 特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬が特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する界面活性剤および／または特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の凝集剤である請求項3記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
5. 特定のリボ蛋白が高密度リボ蛋白 (HDL) であり、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する界面活性剤がポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤である請求項4記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
6. 特定のリボ蛋白が高密度リボ蛋白 (HDL) であり、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の凝集剤がポリアニオンと2価の金属塩の組合せである請求項4記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
7. 遊離グリセロールを消去後に、特定のリボ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を添加することを特徴とする請求項2記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
8. 遊離グリセロールを消去する際に、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中のTGも除去することを特徴とする請求項1記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。

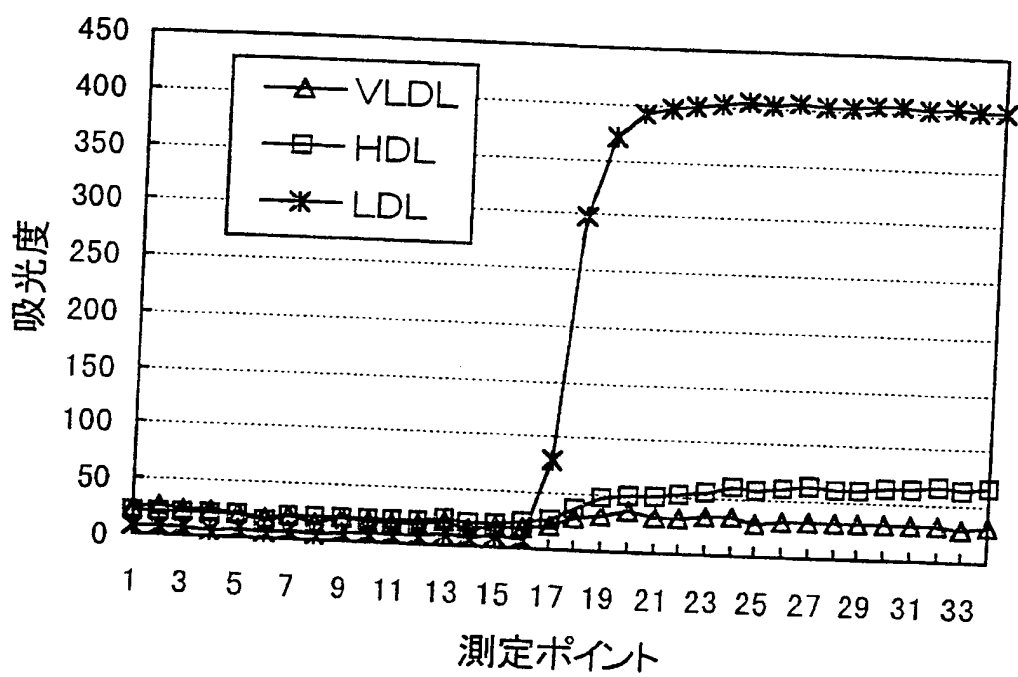
9. 遊離グリセロールおよび特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中のTGを消去する方法が、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬の存在下にLPL、および遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系により過酸化水素を発生させ、次いで該過酸化水素を除去する方法である請求項8記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
10. 特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬が、特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる界面活性剤および／または特定のリボ蛋白の凝集剤である請求項9記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
11. 遊離グリセロールおよび特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白中のTGを消去後に、特定のリボ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を添加することを特徴とする請求項10記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
12. 特定のリボ蛋白が低密度リボ蛋白(LDL)であり、過酸化水素を除去する段階に用いる特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる界面活性剤がポリオキシエチレングリコールアルキルフェニルエーテル(HLB15以上)、またはポリオキシエチレングリコール誘導体で低泡性湿潤浸透剤である請求項10または11記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
13. 遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系が、グリセロールキナーゼ(GK)とグリセロール3-リン酸オキシダーゼ(GPO)を含有する系である請求項1～12記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
14. 遊離グリセロールから過酸化水素を発生させる酵素系が、グリセロールオキシダーゼ(GO)を含有する系である請求項1～12記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
15. 過酸化水素を定量する方法が、過酸化水素にパーオキシダーゼ(POD)と色素源を作用させて色素を生成させ、該色素を吸光度的に定量する方法である請求項1～14記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
16. 色素源が4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬の組み合わせである請求項15記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。

17. 過酸化水素を除去する方法が、過酸化水素にPODと色素源を作用させて色素を生成させ、該色素を酵素的に除去する方法である請求項1～16記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
18. リボ蛋白中のTGを含有する試料が血清または血漿検体である請求項1～17記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量法。
19. 特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬、LPL、GK、GPOおよびPODを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。
20. 特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬、LPL、GOおよびPODを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。
21. 特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK、GPOおよびPODを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。
22. 特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GOおよびPODを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。
23. 特定のリボ蛋白の反応を可能にする界面活性剤および／または酵素を含有する請求項21または22記載の特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。
24. 最終反応液において特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GK、GPOおよびPODを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。
25. 最終反応液において特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白の反応を阻害する試薬もしくは特定のリボ蛋白以外のリボ蛋白を反応させる試薬、LPL、GOおよびPODを含有する特定のリボ蛋白中のTGの定量試薬。

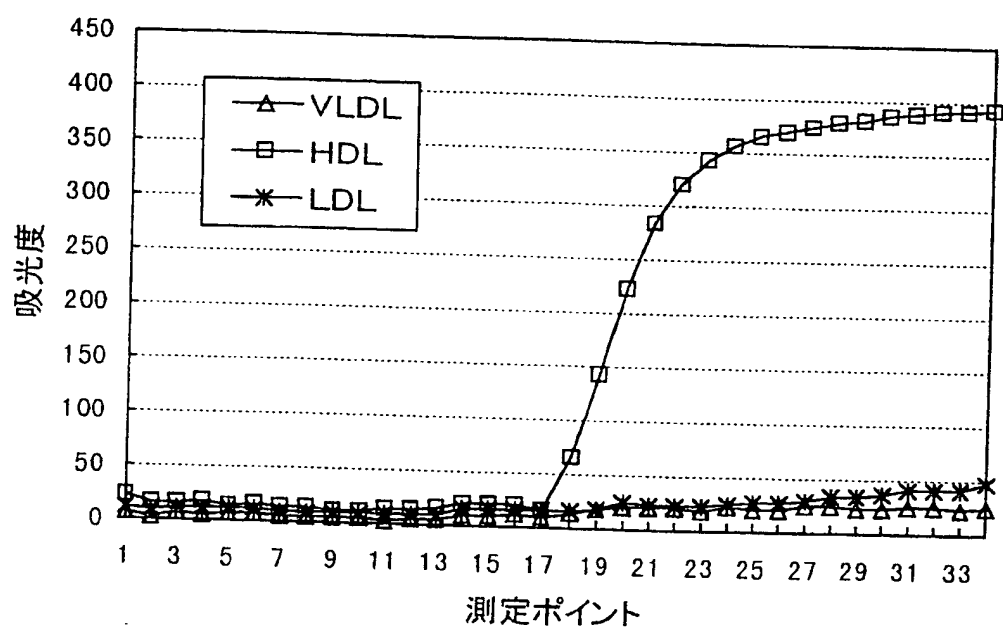
## 第 1 図



第 2 図



## 第 3 図





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int. Cl.<sup>7</sup> C121Q1/61

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> C121Q1/26~1/61

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 57-137858, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 25 August, 1982 (25.08.82) (Family: none)	1-25
X	JP, 59-11197, A (TOYOBO CO., LTD.), 20 January, 1984 (20.01.84) (Family: none)	1-25
Y	JP, 58-47499, A (Iatron Lab. Inc.), 19 March, 1983 (19.03.83) (Family: none)	1-25
A	JP, 9-121895, A (Iatron Lab. Inc.), 13 May, 1997 (13.05.97) (Family: none)	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 April, 2000 (20.04.00)Date of mailing of the international search report  
02 May, 2000 (02.05.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/00246

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 C121Q1/61

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. C17 C121Q1/26~1/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)  
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 57-137858, A (和光純薬工業株式会社) 25. 8 月. 1982 (25. 08. 82) (ファミリーなし)	1-25
X	JP, 59-11197, A (東洋紡績株式会社) 20. 1月. 1 984 (20. 01. 84) (ファミリーなし)	1-25
Y	JP, 58-47499, A (株式会社ヤマトロン) 19. 3月. 1 983 (19. 03. 83) (ファミリーなし)	1-25
A	JP, 9-121895, A (株式会社ヤマトロン) 13. 5月. 1 997 (13. 05. 97) (ファミリーなし)	1-25

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 04. 00

国際調査報告の発送日

0 2.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PTO 03-3309

CY=JP DATE=19830319 KIND=A  
PN=58-047499

METHOD OF MEASURING SUBSTANCES IN BIOTIC FLUID  
[Seitaiekichu no sokuteihoho]

Fumio Nouchi, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C. May 2003

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10): JP
DOCUMENT NUMBER	(11): 58-047499
DOCUMENT KIND	(12): A
	(13): PUBLISHED UNEXAMINED PATENT APPLICATION (Kokai)
PUBLICATION DATE	(43): 19830319 [WITHOUT GRANT]
PUBLICATION DATE	(45): [WITH GRANT]
APPLICATION NUMBER	(21): 56-144568
APPLICATION DATE	(22):
PRIORITY DATE	(32):
ADDITION TO	(61):
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):
PRIORITY COUNTRY	(33):
PRIORITY NUMBER	(31):
PRIORITY DATE	(32):
INVENTOR	(72): NOUCHI, FUMIO; NISHIDATE, KAZUYOSHI.
APPLICANT	(71): Yatoron K.K.
TITLE	(54): METHOD OF MEASURING SUBSTANCES IN BIOTIC FLUID
FOREIGN TITLE	[54A]: Seitaiekichu no sokuteihoho

## 1. Name of this Invention

Method Of Measuring Substances In Biotic Fluid

## 2. Claims

Method of measuring substances in biotic fluid with the following characteristic:

With a method of measuring object substances in a biotic fluid that applies a redox reaction to colorimetrically determine produced hydrogen peroxide using a coloring agent colored by an oxidation-condensation reaction under the existence of peroxidase in the biotic fluid;

the whole chemical sample is divided into (1) a portion containing a substrate or enzyme directly affecting the measuring substances and 4-aminoantipyrine or 3-methyl-2-benzothiazorino hydrozone and (2) a portion containing N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine and other substances including peroxidase, wherein the latter portion is used to remove the interfering substances coexisting in the specimen.

---

\* Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

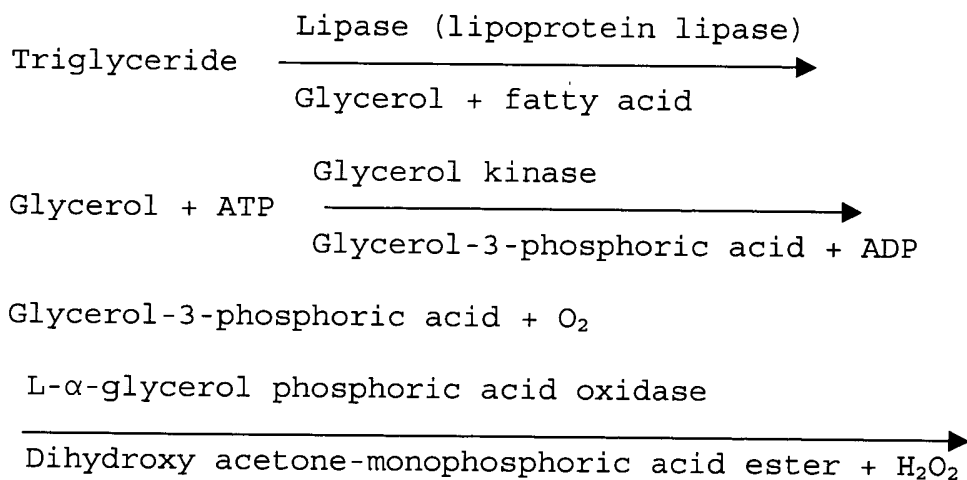
### 3. Detailed Explanation of this Invention

[Industrial field]

This invention pertains to a method that removes interfering substances coexisting in a biotic fluid by utilizing the unique characteristic of N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine (hereinafter, the term 'ESPT' is used) for measuring substances (i.e., substrate or enzyme activities) in a biotic fluid using a redox reaction. This invention particularly pertains to a technique that colorimetrically determines object substances in a specimen using a coloring agent colored by an oxidation/condensation reaction of 4-amino antipyrin or 3-methyl-2-benzothiazolinon hydrozone (hereinafter, the term 'MBTH' is used) and ESPT under the existence of peroxidase. That is, as interference substances coexisting in a specimen create hydrogen peroxide to cause errors to measurements, this invention utilizes the following factors to remove interference substances from a specimen so as to provide more accurate measurements: (1) ESPT characteristic: ESPT itself changes by hydrogen peroxide under the existence of peroxidase when the other element creating an oxidation/condensation reaction with ESPT (in this case, 4-amino antipyrin or MBTH) does not exist, (2) the changed ESPT is colorless, and (3) ESPT, which is water-soluble, does not cause turbidity (toluidine, generally being hardly soluble, shows turbidity). /526

To utilize the reaction that creates hydrogen peroxide due to redox reaction, the simplest approach is a glucose measurement method

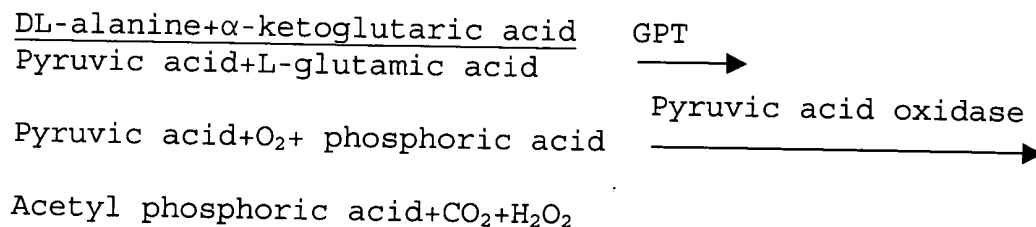
using an enzyme glucose oxidase or urea measurement method using enzyme uricase. Another method is that, after a specific treatment is provided to an object substance, the substance is guided to a redox reaction substrate by utilizing an enzyme; then, hydrogen peroxide is created using boric oxide for colorimetric determination. In this case, the redox reaction, which often occurs in the last phase of reaction after reactions of various mediums, is susceptible to the influences of interference substances coexisting in a specimen. For example, the following reaction is used to measure triglyceride (1):



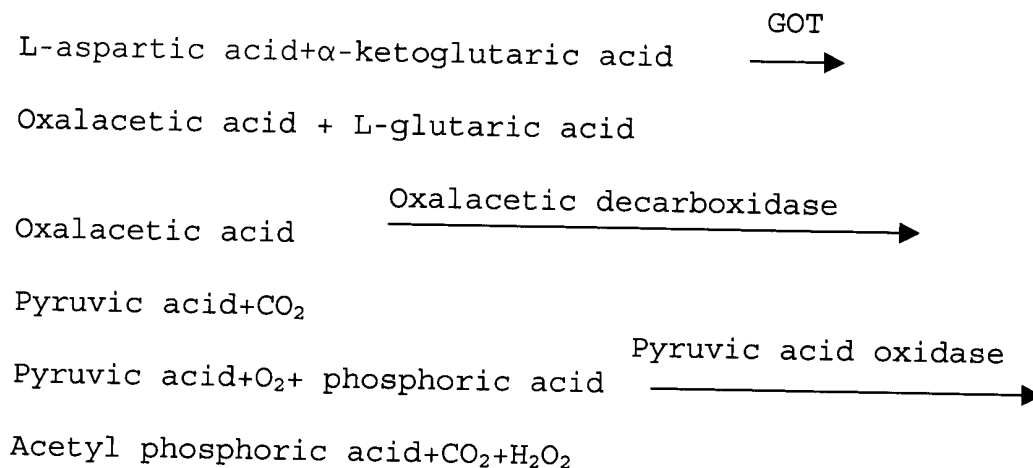
Based on the reaction theory of triglyceride measurement described above, glycerol in the specimen clearly provides an error to the measurement. As human serum contains approx. 0.1 m mol/l of glycerol, which is equivalent to approx. 8 mg/dl of converted triolein, where the amount could be higher in some cases (e.g.,

dialysis patient serum). Also, the activities of transaminase (GOT, GPT) (2) are measured by the following reaction:

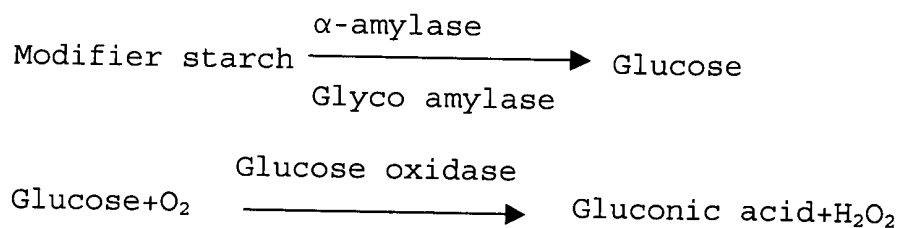
GPT:



GOT:



In those cases, pyruvic acid in the specimen causes errors to the measurement. Pyruvic acid normally exists in human serum for approx. 0.1 m mol/l, which may increase depending on the condition of diseases. Also,  $\alpha$ -amylase activity (3) is measured according to the following reaction:





Based on the theory described above, glucose in a specimen causes errors when measuring the  $\alpha$ -amylase activity. Glucose normally exists in human serum for approx. 6 m mol/l, which may increase depending on the condition of diseases.

In addition to the examples described above, this invention can effectively remove pyruvic acid when measuring free fatty acid formed by a combination of acyl Co-A cyncetase, myokinase, and pyruvic acid oxidase, and choline when measuring phosphoric lipid prepared by combining phospho lipase-D and choline oxidase. Also, this invention should be applied to other measurement cases that may be developed in the future.

To remove those interfering substances, after an enzyme or substrate that directly reacts to the object substance is removed, substances are measured using the conventional method. Then, the obtained values are subtracted from the overall measured values. The problem with this method is that complex computations are necessary, while computed results are not completely accurate. As another method, after coexisting interfering substances are removed under the condition that does not affect measuring substances, produced hydrogen peroxide is removed by adding catalase. Next, after adding a catalase inhibitor, object substances are measured. The problem with this method is that adding a catalase inhibitor results in complex sample compositions and operations. Also, not only cyan natrium (catalase inhibitor) causes an environmental problem, but

also sodium azide produces hydrogen azide in acid.

/527

The developers of this invention investigated various methods to eliminate those problems and discovered a new method that utilized the ESPT characteristic (i.e., ESPT consumes hydrogen peroxide under the existence of peroxidase and changes itself without causing coloring in the absence of the other substance for producing oxidation/condensation).

That is, this invention provides the following method for measuring substances in a biotic fluid:

With a method of measuring object substances in a biotic fluid that applies a redox reaction to colorimetrically determine produced hydrogen peroxide using a coloring agent colored by an oxidation-condensation reaction under the existence of peroxidase in the biotic fluid; the whole chemical sample is divided into (1) a portion containing a substrate or enzyme directly affecting the measuring substances and 4-aminoantipyrine or MBTH and (2) a portion containing ESPT and other substances including peroxidase, wherein the latter portion is used to remove the interfering substances coexisting in the specimen.

The following explains the effectiveness of this invention while referring to test examples.

[Test examples]

Test example 1:

Effectiveness in removing hydrogen peroxide (interference substance):

1. Sample

(1) 0.1 mol/l phosphoric acid buffer liquid (pH 6.6) containing the following substances:

Peroxidase                      0.01 mg/ml

ESPT                              1.0 m mol/l

(2) 0.1 mol/l phosphoric acid buffer liquid (pH 6.5) including:

4-aminot antipyrine 0.5 mmol/l

2. Measurement

0.02 ml of 0 - 1.0 m mol/l  $H_2O_2$  solution were prepared, to which 1.5 ml of Sample (1) were added. Furthermore, 0.02 ml of 0 - 1.0 m mol/l  $H_2O_2$  solution were added and left untouched for 5 minutes.

Then, the optical absorption was measured at 550 nm. Table 1 shows the results. The values in the table designate the absorbency.

Table 1

a							
b	始めに加えた H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の濃度	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
	後から加 えたH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の濃度		mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
	0	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
	0.2 mmol/l	0.104	0.105 <sub>4</sub>	0.104	0.103	0.104	0.104
	0.4 "	0.210	0.210	0.211	0.210	0.211	0.209
	0.6 "	0.313	0.312	0.313	0.314	0.313	0.313
	0.8 "	0.419	0.420	0.420	0.418	0.419	0.419
	1.0 "	0.522	0.522	0.521	0.523	0.522	0.523

Key: (a) Initially added condensation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (b) Later added condensation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

As shown in the table, hydrogen peroxide existing prior to 4- /528 amino antipyrin addition was completely removed by peroxidase and ESPT, and therefore, not affecting the succeeding measurements results.

# 1. Sample

## (1) Boric acid buffer liquid (ph 6.5) containing:

Mutarotase                      10 U/ml  
 Glucose oxidase                2 x 10<sup>4</sup> U/ml  
 Peroxidase                      2 x 10<sup>4</sup> U/ml  
 ESPT                                1.0 m mol/l

## (2) Boric acid buffer liquid (ph 6.3) containing:

4-amino antipyrin              0.4 m mol/l

## 2. Measurement

Using the sample prepared as described above, the following three tests were conducted:

(1) 0 - 400 mg/dl of standard glucose liquid and three kinds of serums described below were prepared, to which 2 ml of Sample (1) were added and left untouched for 5 minutes at 37°C. Then, 2 ml of Sample (2) were added and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

(2) Standard glucose liquid and serum described above were respectively measured for 20  $\mu$ l, to which 2 ml of Sample (1) and 2 ml of Sample (2) were simultaneously added, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

(3) 20  $\mu$ l of 100 mg/dl standard glucose solution were prepared, to which 2 ml of Sample (1) was added, mixed, and left untouched for 5 minutes at 37°C. Then, 20  $\mu$ l of glucose standard liquid described above and 20  $\mu$ l of serum were added, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

Table 2 shows the measurement results of three tests described above. The values in the table designate the absorption ratios.

Table 3

	検 体	b		
		測定(1)	測定(2)	測定(3)
a	水	0.006	0.006	0.006
c	グルコース標準液 100mg/4dl	0.006	0.357	0.358
	200 "	0.006	0.709	0.707
	300 "	0.006	1.050	1.051
	400 "	0.007	1.700	1.698
d	血 清 1	0.008	0.408	0.405
	2	0.007	0.488	0.489
	3	0.009	0.527	0.525

Key: (a) Water; (b) Measurement; (c) Standard glucose solution; (d) Serum; (e) Specimen.

The following can be concluded by the results shown in the table:

According to measurement 1, glucose could be removed by Sample (1) regardless of the concentration. Also, based on measurement 2, a mixture of Samples (1) and (2) could allow measurements at various levels of glucose concentrations. With measurement 3, after removing the initially existing glucose using Sample (1), Sample (2) could be used to measure various levels of glucose concentrations in the solution. Furthermore, since the measurement results of Measurements (2) and (3) were equal within a measurement error range, removing the glucose (initial interference substance) using the method based on this invention did not affect the succeeding glucose measurement.

Test example 3:

Effectiveness in removing pyruvic acid (interference substance):

1. Sample

(1) 0.1 mol/l dimethyl glutarate buffer solution (Ph 7.2) including the following:

Thiamine pyrophosphate	0.5 m mol/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 m mol/l
MgCl <sub>2</sub>	30 m mol/l
ESPT	1.0 m mol/l
Peroxidase	0.01 m mol/l
Pyruvic acid oxidase	7 m mol/l

(2) 0.1 mol/l dimethyl glutarate including:

4-amino antipyrin buffer solution (pH 7.2)

0.8 m mol/l

2. Measurement

/529

Using the sample prepared as described above, the following two tests were conducted:

(1) Pyruvic acid standard solution for amounts of 0.1 m mol/l and 1.0 m mol/l of and fifteen kinds of serums (20 µl each) were prepared, to which 1.5 ml of Sample 1 were added and left untouched for 5 minutes at 37°C. Then, 1.5 ml of Sample 2 were added and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

(2) 20  $\mu$ l of pyruvic acid standard solution and 20 ml of serum were prepared, to which 1.5 ml of Sample (1) and 1.5 ml of Sample (2) were simultaneously added, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

Table 3 shows the results of two measurements described above. Numeric values in the table designate absorption ratios.

Table 3

Pyruvic acid solution      Specimen      Measurement

Serum	検 体	測定(1)   測定(2)	
		測定(1)	測定(2)
	ピルビン酸液 0.1 mmol/l	0.000	0.016
	1.0 mmol/l	0.002	0.164
	血 清      1	0.002	0.006
	2	0.003	0.098
	3	0.003	0.014
	4	0.002	0.07
	5	0.002	0.04
	6	0.001	0.002
	7	0.002	0.003
	8	0.003	0.004
	9	0.003	0.03
	10	0.002	0.002

As shown in the table, the method based on this invention is effective to pyruvic acid in the same way as described in Tests 1 and 2.



Test 4:

Glycerol interference substance removable effectiveness:

1. Sample

(1) 100 m mol/l tris-hydrochloric acid buffer solution (Ph 7.0)

including the following:

Glycerol kinase 13 U/l

L-glycerol-3-phosphoric acid oxidized enzyme

1300 U/l

Peroxidase  $3 \times 10^4$  U/l

Adenosine triphosphate 0.4 m mol/l

ESPT 1.0 m mol/l

MgCl<sub>2</sub> 2 m mol/l

TritonX-100 1 g/l

(2) 100 m mol/l tris-hydrochloric acid buffer solution (pH 7.0):

4-aminoantipyrine 0.8 m mol/l

Triton X-100 1 g/l

2. Measurement

Using the sample prepared as described above, the following three tests were conducted:

(1) 20  $\mu$ l of various concentrations of glycerol standard solutions (0 - 1000 mg/dl converted to triglyceride) were prepared, and 1.5 ml of Sample 1 were added to each solution and left untouched for 5 minutes at 37°C. Then, 1.5 ml of Sample 2 were added and left

untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

(2) 20 µl of various concentrations of glycerol standard solutions were prepared, and 1.5 ml of Sample 1 and 1.5 ml of Sample 2 were simultaneously added to each solution, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

(3) 20 µl of various concentrations of glycerol standard solutions (100 mg/dl converted to triglyceride) were prepared, and 1.5 ml of Sample 1 were added to each solution and left untouched for 5 minutes at 37°C. Then, 1.5 ml of Sample 2 and glycerol standard solution described above were added and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

Figure 1 shows the results of three measurements described above. As shown in the figure, the following could be discovered: /530

From Measurement 1, sample 1 could remove glycerol regardless of the concentration of glycerol. From Measurement 2, mixing samples 1 and 2 could allow measurements at various concentrations of glycerol. From Measurement 3, after removing glycerol pre-existing in sample 1, various densities of glycerol could be measured from sample 2. Furthermore, since results obtained from Measurements 2 and 3 were equal within a measurement error range, it is clear that, although the glycerol initially existed as an interference substance was

removed using the method based on this invention, such glycerol removal did not affect the succeeding glycerol measurement.

The following explains the operational examples of this invention.

#### Operational example 1:

Measuring triglyceride in serum:

##### 1. Sample

(1) 100 m mol/l tris-hydrochloric acid buffer solution (Ph 7.0)

including the following:

Glycerol kinase	13 U/l
L-glycerol-3-phosphoric acid oxidized enzyme	1300 U/l
Peroxidase	$3 \times 10^4$ U/l
Adenosine triphosphate	0.4 m mol/l
ESPT	1.0 m mol/l
MgCl <sub>2</sub>	2 m mol/l
Triton X-100	1 g/l

(2) 100 m mol/l tris-hydrochloric acid buffer solution (pH 7.0)

including the following:

Lipase (containing a lipo protein lipase function)

	$5 \times 10^5$ U/l
4-amino antipyrin	0.8 m mol/l
Triton X-100	1 g/l

##### 2. Measurement

After 1.5 ml of Sample 1 were added to 20  $\mu$ l of sample serum, the mixture was left untouched for 5 minutes at 37°C in order to remove free glycerol existing in the serum as an interference substance. Although most of interference substances were glycerol, other side reactions related to glycerol kinase and others were all eliminated.

Then, 1.5 ml of Sample 2 were added and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the solution was measured at 550 nm. Since this method could remove at least 20 times (i.e., 2 m mol/l - equivalent to 1800 mg/ dl of triglyceride) of the quantity of free glycerol normally existing in the serum, an extra step was not specially needed for standard clinical tests conducted for determining triglyceride in serum.

The following three tests were conducted using 46 samples obtained from dialysis patients: Test 1, which was the method based on this invention (after removing free glycerol by performing a pre-process, neutral fat is measured), Test 2 that measured glycerol and fat without performing a pre-process, and Test 3, which was a conventional method that measured free glycerol from the sample obtained in Test 2 and subtracted the result from the total measurement. Figures 2 and 3 show the results of those tests.

The following correlations are shown in Figure 2:

Regression formula  $y = 1.35 x + 102$

Correlation coefficient  $R = 0.966$

The following correlations are shown in Fig. 3:

Regression formula  $y = 0.99 x + 13$

Correlation coefficient  $R = 0.999$

For Test 2 (no pre-processing), 1.5 ml of sample 1 and 1.5 ml of sample 2 were simultaneously added to 20  $\mu$ l of specimen, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

For Test 3 (measuring free glycerol only), 1.5 ml of sample 1 and 1.5 ml of sample 2 from which lipase was excluded were simultaneously added to 20  $\mu$ l of specimen, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. The light absorption of the solution was measured at 550 nm.

As shown in Fig. 2, the results obtained from the method based on this invention did not match the results obtained from Test 2 (no pre-processing). However, they were fairly equal to the results obtained from Test 3 (separate processing) shown in Fig. 3.

Operational example 2:

Measuring  $\alpha$ -amylase activity in serum:

1. Sample

(1) 40 m mol/l maleic acid buffer solution (Ph 6.5) including the following:

Gluco amylase 15 U/ml

Glucose oxidase  $2 \times 10^4$  U/ml

Peroxidase 10 U/ml

Mutarotase	10 U/ml
ESPT	2 m mol/l
KCl	80 m mo/l
CaCl <sub>2</sub>	7 m mol/l

(2) 200 m mol/l maleic acid buffer solution (pH 6.3) containing the following:

4-amino antipyrin	0.4 m mol/l
Modifier starch	5 mg/ml

(3) Succinic acid 0.6 m mol/l

## 2. Measurement

After 20  $\mu$ l of glucol standard solution (0 - 400 mg/dl) were added to 20  $\mu$ l of specimen, 2 ml of Sample 1 were added and left untouched for 5 minutes at 37°C in order to remove the added glucose and glucose existing in the specimen. Next, 2 ml of Sample 2 were added, mixed, and left untouched for 10 minutes at 37°C. Then, after 1 ml of Sample 3 was added, the light absorption of the liquid was measured at 550 nm.

Since this method could remove at least 5 times (i.e., approx. 30 m mol/l) of glucose quantity normally existing in serum, an extra step was not particularly needed for the standard clinical tests conducted for determining  $\alpha$ -amylase activity in serum.

Table 4

		Added glucose				
Specimen	α-amylase originat	添加グルコース (mg/dl) 検体 (IU/dl)	0	100	200	400
		だ液由来の α-アミラーゼ	561	557	568	559
Serum		血清	239	245	234	242

As shown in Table 4, α-amylase activity could be measured without any influence of glucose in the specimen.

As explained above, the method based on this invention can remove interfering substances prior to measuring object substances in the serum. In this case, special samples or procedures are not required. In addition, the method based on this invention does not require an extra operation for removing the influence of interfering substances by obtaining the blank specimen. Therefore, this invention is extremely useful for standard clinical testing, as it can provide a simple and accurate method of measuring object substances not requiring any extra procedure.

#### 4. Simple Explanation of the Figures

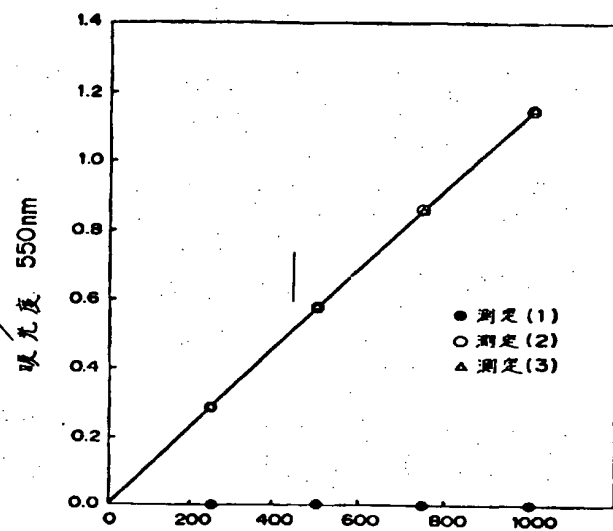
Figure 1 is a graph showing the relation between the glycerol standard solution and light absorption ratio. Figure 2 is a graph showing the correlation between a triglyceride measurement with a

separate processing and triglyceride measurement with no pre-processing. Figure 3 is a graph showing the correlation between a triglyceride measurement based on this invention and triglyceride measurement with a separate processing.



Figure 1

Absorbency  
Measurement



Glycerol standard solution  
(converted to triglyceride)

Figure 2

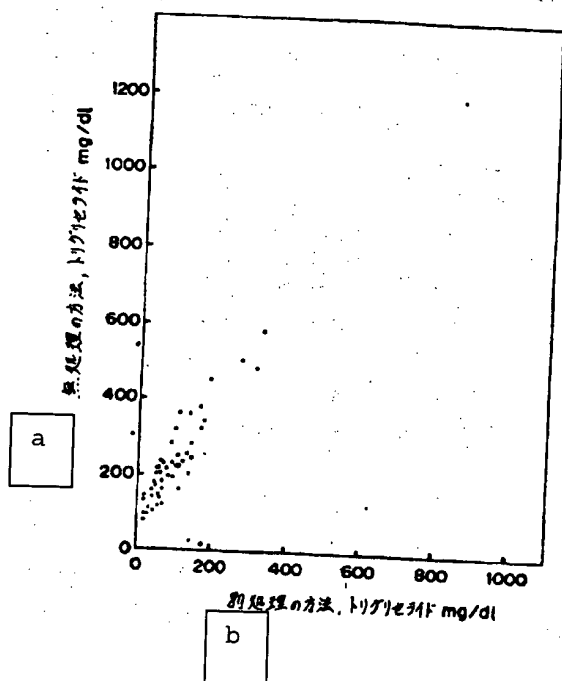
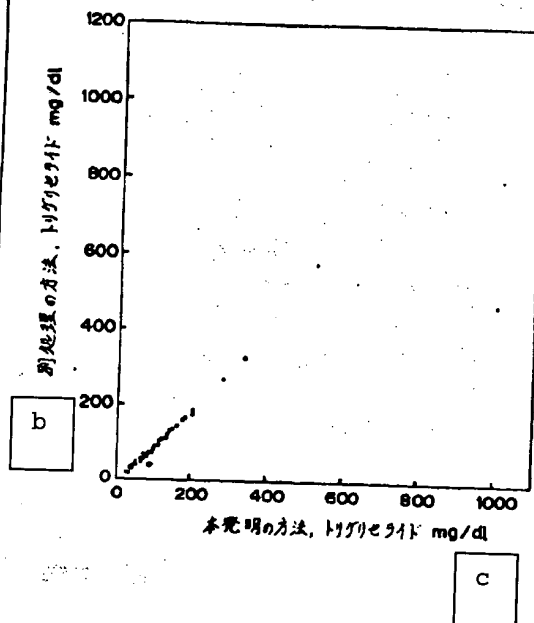


Figure 3



Key:

- (a) Non-processing method (triglyceride mg/dl)
- (b) Separate processing method (triglyceride mg/dl)
- (c) Method based on this invention (triglyceride mg/dl)

L11 ANSWER 12 OF 23 CA COPYRIGHT 2003 ACS

AN 98:212562 CA

TI Process and reagents for the selective **separation** of low-density lipoproteins (LDL) and for the quantification of their components

IN Trouyez, Gerard; Alcindor, Louis Gerald

PA Biomerieux S. A., Fr.

SO Eur. Pat. Appl., 11 pp.

CODEN: EPXXDW

DT Patent

LA French

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	EP 76211	A2	19830406		
	EP 76211	A3	19830601	EP 1982-401735	19820927
	EP 76211	B1	19870527		
	R: AT, BE, CH, DE, GB, IT, LI, LU, NL, SE				
	FR 2513766	A1	19830401		
	FR 2513766	B1	19850913	FR 1981-18220	19810928
	ES 515987	A1	19831101		
	AT 27495	E	19870615	ES 1982-515987	19820927
	ES 524070	A1	19840416	AT 1982-401735	19820927
PRAI	FR 1981-18220		19810928	ES 1983-524070	19830712
	EP 1982-401735		19820927		

AB A method is described for the selective pptn. of LDL and for the detn. of their components (cholesterol, apolipoproteins, triglycerides, phospholipids) in body fluids and tissues without pptn. of high-d. or very-low-d. lipoproteins by using a reagent contg. **polyanions**, e.g., PEG or heparin, with or without divalent cations, a detergent, aryl or alkyl ethers of alc. polymers, fatty acid salts, and bile acid salts. The ppt. then is sepd. by centrifugation, dissolved by chelating agents, and the LDL are detd. by turbidimetry or nephelometry. Thus, LDL were isolated from serum by using a pptg. reagent contg. heparin, MnCl<sub>2</sub> (12-120 mM), PEG 6000 or Triton X 100 (0.5-10.0 g/L), and a bile salt (0.5-5 g/L). The ppt. was solubilized with a soln. contg. 0.15M NaCl and EDTA or Na citrate.

IC G01N033-92

CC 9-9 (Biochemical Methods)

ST lipoprotein low density pptn analysis; body fluid lipoprotein pptn analysis; tissue low density lipoprotein pptn

IT Glycerides, analysis  
Phospholipids

RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)  
(detn. of, in low-d. lipoproteins, reagent for low-d. lipoproteins pptn. in)

IT Chelating agents  
(in low-d. lipoproteins pptn. from body fluids and tissues)

IT Animal tissue  
Body fluid  
(low-d. lipoproteins of, pptn. of, anal. in relation to)

IT Precipitation  
(of low-d. lipoproteins, of body fluids and tissues)

IT Lipoproteins  
RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)  
(apo-, detn. of, in low-d. lipoproteins, reagent for low-d. lipoproteins pptn. in)

IT Lipoproteins  
RL: ANST (Analytical study)  
(low-d., pptn. of, of biol. fluids and tissues, anal. in relation to)

IT 57-88-5, analysis 57-88-5D, esters  
RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)  
(detn. of, in low-d. lipoproteins, reagent for low-d. lipoproteins pptn. in)